



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: 07265093

(43)Date of publication of application: 17.10.1995

(51)Int.Cl.

C12P 21/02
C07K 14/705
C12N 5/10
C12N 15/09
// A61K 39/12
(C12P 21/02
C12R 1:91)
(C12N 5/10
C12R 1:91)

(21)Application number: 06085911

(71)Applicant:

CHEMO SERO THERAPEUT RES INST
TOKYO MET GOV SHINKEI KAGAKU
SOGO KENKYUSHO

(22)Date of filing: 30.03.1994

(72)Inventor:

YASUI KOTARO
MUKOGAWA JUN
OKA TETSUYA

(54) PRODUCTION OF SURFACE ANTIGEN PROTEIN OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS USING
MAMMALIAN CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new production process of surface antigen protein of Japanese encephalitis virus which is useful as a prophylactic medicine or diagnostic agent for Japanese encephalitis.

CONSTITUTION: An expression vector into which the whole or a part of cDNA coding for the surface antigen protein (E protein) of Japanese encephalitis virus is incorporated together with the whole or a part of cDNA coding for the matrix protein of the virus, or the whole or a part of cDNA coding for the prematrix protein of the virus, or a part of the core protein of the virus, is introduced into the host mammalian cells to effect efficient production of E (envelope) protein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998 Japanese Patent Office

[MENU](#)

[SEARCH](#)

[INDEX](#)

[DETAIL](#)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-265093

(43)公開日 平成7年(1995)10月17日

| | | | | |
|--------------------------|------|---------|---------------|-----------------------------|
| (51)Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 P 21/02 | C | 9282-4B | | |
| C 0 7 K 14/705 | | 8318-4H | | |
| C 1 2 N 5/10 | | 7729-4B | C 1 2 N 5/ 00 | B |
| | | 9281-4B | 15/ 00 | Z N A A |
| | | 審査請求 | 未請求 | 請求項の数 6 F D (全 15 頁) 最終頁に続く |

(21)出願番号 特願平6-85911

(22)出願日 平成6年(1994)3月30日

(71)出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所
熊本県熊本市清水町大窪668番地

(71)出願人 000173832

財団法人東京都神経科学総合研究所
東京都府中市武蔵台2丁目6番地

(72)発明者 保井 孝太郎

東京都立川市若葉町2-26-32

(72)発明者 向川 純

埼玉県浦和市前地3-2-9

(72)発明者 岡 徹也

熊本県熊本市湖東2丁目44-2

(54)【発明の名称】 哺乳動物細胞を用いる日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質の製法

(57)【要約】

【目的】 日本脳炎の予防薬あるいは診断試薬として有用な日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質の新規な製法を提供する。

【構成】 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)をコードするcDNAの全部または一部が日本脳炎ウイルスのマトリックス蛋白質をコードするcDNAの全部または一部、日本脳炎ウイルスのプレマトリックス蛋白質をコードするcDNAの全部または一部および日本脳炎ウイルスのコア蛋白質の一部とともに組み込まれている発現ベクターを動物細胞に移入し、目的のE蛋白質を効率的に産生させる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)をコードする cDNA の全部または一部を組み込んだ組換え発現ベクターを哺乳動物細胞に移入し、該動物細胞を培養し、発現した日本脳炎ウイルス表面抗原(E蛋白質)を回収することを特徴とする日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【請求項 2】 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)をコードする cDNA の全部または一部が日本脳炎ウイルスのマトリックス蛋白質をコードする cDNA の全部または一部とともに組み込まれている請求項 1 記載の日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【請求項 3】 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)をコードする cDNA の全部または一部が日本脳炎ウイルスのプレマトリックス蛋白質をコードする cDNA の全部または一部とともに組み込まれている請求項 1 記載の日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【請求項 4】 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)をコードする cDNA の全部または一部が日本脳炎ウイルスのマトリックス蛋白質をコードする cDNA の全部または一部、日本脳炎ウイルスのプレマトリックス蛋白質をコードする cDNA の全部または一部および日本脳炎ウイルスのコア蛋白質の一部とともに組み込まれている請求項 1 から請求項 3 記載の日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【請求項 5】 上記日本脳炎ウイルスのコア蛋白質の一部がコア蛋白質のアンカー領域(105 番目のアルギニンから 127 番目のアラニン)である請求項 4 記載の日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【請求項 6】 前記哺乳動物細胞が CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、COS 細胞(アフリカミドリザル腎臓由来 SV40 形質転換細胞)並びに Vero 細胞(アフリカミドリザル腎臓由来細胞)より選択される請求項 1 から請求項 5 に記載の日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質(E蛋白質)の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、日本脳炎の予防薬あるいは診断試薬として有用な日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質に関するものであり、さらに詳細には遺伝子組換え技術を用いて形質転換させた哺乳動物細胞による当該蛋白質の産生方法に関する。

【0002】

【従来技術および発明が解決しようとする問題点】日本脳炎は、日本脳炎ウイルスの感染によって引き起こされる高い死亡率と重篤な後遺症を残す伝染性の疾患である。近年、わが国においては患者数が減少してはいるが、なお、東アジアから東南アジアさらには南アジアに

いたる諸国ではしばしば大流行し、流行地域のみならず国際化が進み国交の激しい現代においては世界的に大きな社会問題となっている。

【0003】日本脳炎ウイルスは、トガウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスである。日本脳炎ウイルスの遺伝子は分子量が約 $3.8 \times 10^6 \sim 4.2 \times 10^6$ の一本鎖 RNA からなり、かかる遺伝子により発現される日本脳炎ウイルス粒子の構造蛋白質は次の 3 種類に大別されている：エンベロープの主要部を占めている E 蛋白質(表面抗原蛋白質：分子量約 53,000)、エンベロープの小さい蛋白質 M(マトリックス蛋白質：分子量約 8,700)およびヌクレオキャプシッドの蛋白質 C(コア蛋白質：分子量約 13,500)。このうち特に、E 蛋白質はウイルス感染の成立に重要な役割を演じるため、予防医学並びに診断学の分野では、E 抗原のエピトープ(抗原決定基)の詳細な構造解析が精力的に行なわれている。現在、中和活性、赤血球凝集活性、赤血球溶血活性などを指標として E 抗原の研究が進められており、当該抗原には少なくとも 9 種類のエピトープの領域が存在することが報告されている。また、フラビウイルス全般に種の間で相互に近縁ないしは類似の抗原を持っていることも明らかになっている。

【0004】日本脳炎に対する予防薬、ワクチンとしては、従来、不活化日本脳炎ウイルスを有効成分とするワクチンが用いられており、これは健康なマウスの脳内に日本脳炎ウイルス例えば中山予研株を接種し、発症したマウスから脳を無菌的に採取し、アルコール・プロタミン法により精製、不活化して不活化日本脳炎ウイルスワクチン原液を得る方法に基づく(国立予防衛生研究所学会編「日本のワクチン」改訂 2 版(昭和 52 年 1 月 20 日丸善株式会社発行))。しかしながら、このようなワクチンの製造方法においては、大量の日本脳炎ウイルスそのものを取り扱うわけで、ワクチン製造担当者にとっては危険性が極めて高く、その上、製造コストも高いものであった。

【0005】ワクチンとしては、ウイルスそのものではなく、ウイルスの抗原性を有する抗原性蛋白質を用いることもでき、組換え DNA 技術によって原核細胞または真核細胞中で所望の抗原蛋白質を産生させる試みが検討されるようになった。この際のターゲットとなるのが上述の E 蛋白質である。日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質である E 蛋白質を酵母を宿主とする遺伝子操作技術によって発現させようとする試みがなされたが、本来の E 蛋白質の量的な産生には至らなかった(第 34 回日本ウイルス学会予稿集第 91 ページ 昭和 61 年 10 月)。

【0006】本発明者らは、近年、生ワクチンとして用いられているワクチニアウイルスに日本脳炎ウイルスの E 蛋白質をコードする cDNA を組み込んで発現させることに成功した(特開昭 64-74982 号)。しかし、この組換えウイルスは生ワクチンとして有望ではある

が、発現させた蛋白質を回収して、ワクチンや診断試薬として利用するには産生量が少ないという問題がある。また、ワクチニアウイルスそのものの混入が避けられず、アレルギー反応などの副作用が危惧され、そのままワクチンとして用いるには問題があった。

【0007】一方、昆虫ウイルスベクターを用いて昆虫細胞で外来遺伝子を発現させる方法が提案されるようになり(特開昭60-37988号、特開昭61-5787号)、これらの方法での発現蛋白量は、他の発現系より著しく高いことが報告されている。

【0008】ところで、トガウイルス科フラビウイルス属に属する日本脳炎ウイルスは、一本鎖RNAをゲノム(ウイルスの遺伝情報を担う本体)とし、ウイルスの感染細胞内においてモノシストロニックにゲノムから翻訳された一本のポリペプチドがコア蛋白質、マトリックス蛋白質、E蛋白質および5種類の非構成蛋白質へとプロセッシング(一本のポリペプチドが細胞内のプロテアーゼで切断されて各々の蛋白質を生じること)されるという特徴をもつため、E蛋白質をコードするcDNAそのものをバキュロウイルスに直接組み込んで発現させることは操作上困難であった。

【0009】そこで、本発明者等は日本脳炎ウイルスのゲノムRNAを鋳型とし調製したcDNAよりE蛋白質をコードする領域を選択し、バキュロウイルスの増殖に非必須な領域に組み込んだ場合、感染昆虫細胞においてワクチンや診断試薬として利用可能な日本脳炎ウイルスE蛋白質を大量に発現する技術を完成した(特開平1-285198号)。しかしながら、この場合においても得られた日本脳炎ウイルスE蛋白質を主成分として薬剤を調製する場合、感染に用いる昆虫細胞夾雑成分の混入が避けられず、アレルギー反応などの副作用が危惧され、そのままワクチンとして用いるには問題があった。また、これら組換えウイルスを使用する場合、組換え技術に関する特別な物理的封じ込め施設が不可欠である。

【0010】本発明者らはかかる従来技術の背景の下で、日本脳炎ウイルスE蛋白質を大量に製造する方法の開発をめざして鋭意検討を進めた結果、日本脳炎ウイルスのゲノムRNAを鋳型とし調製したcDNAよりE蛋白質をコードする領域を選択し、この領域を好適な発現ベクター、例えばpCDL-SR α 、pMAM-neoベクターに挿入し、当該ベクターをCHO細胞、COS細胞並びにVero等の哺乳動物細胞に移入したところ、当該宿主哺乳動物細胞においてワクチンや診断試薬として利用可能な日本脳炎ウイルスE蛋白質が大量に発現されることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。本発明によってもたらされる技術によれば、サルあるいはヒトの細胞を初めとする宿主哺乳動物細胞の培養上清中に所望のE蛋白質が分泌され、組換えウイルスの混入もなく、精製が容易でアレルギー等副作用の原因となる夾雑物の少ない安全性の高いワクチンを

調製することができる。

【問題点を解決するための手段】

【0011】かくして、本発明によれば、日本脳炎ウイルスのE蛋白質をコードするcDNAを好適なベクターに組み込んだ組換えベクターを宿主動物細胞に移入し、該動物細胞を培養し、発現した日本脳炎ウイルスE蛋白質を回収する方法が提供される。

【0012】本発明の概略は以下のとおりである。

- (1) 日本脳炎ウイルスの遺伝子RNAを抽出する工程: この工程の技術は従来の公知の常法、例えばフェノール抽出法等により実施することができる。
- (2) ウイルスRNAに相補的な二重鎖cDNAを調製する工程: この工程の技術は、例えば逆転写酵素を用いる公知の常法により実施することができる。
- (3) cDNAをクローニングし、その塩基配列を決定する工程: この工程で用いるクローニングベクターとしては、大腸菌、枯草菌等の原核細胞を宿主とするプラスミド、また、 λ ファージ、T4系ファージ等のバクテリオファージ由来のベクター等公知のものを使用することができる。この工程では、クローニングベクターとその宿主細胞とを適宜組み合わせ使用することが好ましい。クローニングに用いられるベクターの具体例としては、例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC7、pUC8、pUC9、pUC19などのプラスミド、 λ ファージ、M13ファージなどのファージ類あるいはpHC79(ジーン、1、291、(1980))などのコスミドが例示される。遺伝子の挿入方法は常法に従えばよく、例えばベクターのプロモーターの下流にある人為的に付与された制限酵素切断点を利用して日本脳炎ウイルス由来のcDNA断片を挿入すればよい。これらベクターの構築に当たっては、遺伝子操作の容易な大腸菌の系が特に好ましく、使用するプラスミドベクターも目的に相応しいものである限り特に限定されるものではない。

- 【0013】(4) クローニングされたcDNAがE蛋白質をコードする遺伝子を含んでいることを同定する工程: 細胞由来の構造遺伝子は、その翻訳の開始と終止の領域に特定のDNA塩基配列を有しており、かつ、その調節遺伝子の構造にも類似性があるため、かかる構造遺伝子の領域の検出と同定は比較的容易である。これに対して、E蛋白質をコードする遺伝子には翻訳の開始領域、終止領域および調節遺伝子が存在せず、特定の塩基配列を指標として採用できないため、E蛋白質をコードする遺伝子領域の検出と同定は極めて困難である。本発明者らの長年を経て培われた深い洞察力と優れた技術に基づきクローニングされたcDNAの迅速な塩基配列の解析、およびかかるcDNAの発現とその発現産物の免疫学的検出同定を巧みに組み合わせ駆使することにより、また、既に報告されている黄熱ウイルスおよびウエストナイルウイルスのE蛋白質をコードする遺伝子の塩

基配列並びにE蛋白質のアミノ酸配列とを比較検討することにより、上記困難が克服される。

【0014】日本脳炎ウイルスの表面抗原蛋白質をコードするcDNAは、例えば前記中山予研株、Ja0Ar株(米国コネチカット州のエル大学アーボヴィラスリサーチユニット)あるいはSagayama株(同所)を用いて調製することができる。例えば、上記Sagayama株から調製されたE蛋白質をコードするcDNAは図1～5に示されるように全部で約1500塩基対から構成されているが、本発明においては上記cDNAと実質的に同一の機能を有する範囲において、修飾されたcDNA(即ち、塩基配列が置換、挿入、欠失したもの)であってもよい。もちろん、実質的に同一の機能を保持する限り、アミノ酸配列が異なる程度に修飾されたものであってもよい。

【0015】(5) クローニングされたE蛋白質をコードする遺伝子内の領域を発現させる工程:この工程で用いる発現ベクターとしては、SV40等のウイルス遺伝子由来の発現ベクター等公知のものを使用することができるが、広い宿主域で高いプロモーター活性を示すSR α プロモーターを有するベクター、例えばpCDL-SR α は好ましい態様である。pCDL-SR α ベクターは国立予防衛生研究所 武部博士らによって創製され、Okayama-Berg法のベクタープライマーとリンカーを同一のプラスミドにまとめ、SV40プロモーターに代えてSR α と呼ばれる高い発現効率を発揮するプロモーターを組み込んだベクターである(モレキュラー アンド セルラー バイオロジー(Molecular and Cellular Biology), 8, p. 466-472(1988))。SR α プロモーターはSV40プロモーターとHTLV-1.LTRのR-U5配列を接続したもので、広い宿主域で高いプロモーター活性を示す。

【0016】この工程では、発現ベクターとその宿主細胞とを適宜組み合わせ選別し使用することが望ましい。この工程で特に留意すべき困難な点として、E蛋白質をコードする遺伝子と公知の発現ベクターとを単純に連係したものを宿主細胞に移入することにより得られた形質転換体では、免疫原性を有するE蛋白質の生産が殆ど期待できないことである。即ち、E蛋白質をコードする遺伝子と公知の発現ベクターとの連係には、大略以下の工夫を要する。a) E蛋白質をコードする遺伝子は翻訳の開始と終止の領域を有しないので、これらを補充する。b) 所望の抗原性並びに免疫原性を有する発現産物を得るために、E蛋白質をコードする遺伝子の全部あるいはどの部分を発現ベクターに連係するかを決定する。c) 発現産物の抗原性並びに免疫原性を高める。d) 発現ベクターおよび形質転換体の遺伝的安定性を高める。e) 発現産物の収量を高める。f) 発現産物を細胞外へ分泌させ精製工程を容易にする。これらの工夫は主に発現ベクターの改造構築により達成できる。

【0017】ところで、日本脳炎ウイルスの蛋白質は前

述のようにモノシストロニックに合成された後に、プロセッシングされて表面抗原蛋白質等にわかれる。従って、全ウイルスゲノムに対するcDNAを挿入すれば人為的に翻訳開始コドンおよび翻訳終止コドンを挿入する必要はない。また、挿入するcDNAがE蛋白質をコードする領域に加え、その上流に翻訳開始コドンになりうる配列(例えばATG)を有する場合にも同様である。しかし、E蛋白質をコードするcDNAのみを組み込もうとするときはプロモーターの下流に存在する制限酵素切断点を利用し、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンおよび両者間に制限酵素切断配列を有する合成リンカーを組み込むことが必要となってくる。

【0018】挿入する翻訳終止コドンは、E蛋白質をコードするcDNAの読み取り枠が何れであっても合致するように読み取り枠をずらせて3ヶ所に設けることが望ましい。挿入するcDNAはE蛋白質をコードする領域を含むものであればその他に他の蛋白質をコードする領域を含むものであってもよい。フラビウイルス属に属するウイルスについては、E蛋白質をコードする領域の上流にマトリックス蛋白質(以下M蛋白質と称する)、プレマトリックス蛋白質(以下PreM蛋白質と称する)、コア蛋白質(以下C蛋白質と称する)をコードする領域が存在しているが、本発明においてはこれらの蛋白質をコードするcDNAの全部または一部がE蛋白質をコードするcDNAの上流に結合したものをを用いてもよい。

【0019】挿入するcDNAは、M蛋白質をコードするcDNAの全部または一部、PreM蛋白質をコードするcDNAの全部または一部および日本脳炎ウイルスのC蛋白質の一部がE蛋白質をコードするcDNAの全部または一部の上流に結合したものが、本発明における好適な実施態様として推奨される。この場合、細胞質内のみならず、細胞培養上清に目的のE蛋白質が大量に放出され、後の所望の蛋白質の精製の観点から大きな特長を有する。

【0020】E蛋白質発現ベクターを移入する宿主細胞としては、E蛋白質を発現することができる動物細胞であればいかなるものでもよいが、好ましくは目的とする形質転換動物細胞を容易に分離することが可能な哺乳動物細胞、例えばCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、COS細胞(アフリカミドリザル腎臓由来SV40形質転換細胞)あるいはVero細胞(アフリカミドリザル腎臓由来細胞)などが用いられ得る。

【0021】組換え形質転換動物細胞の作製にあたって、形質転換用遺伝子断片の宿主細胞への導入は、既知の方法、例えばリン酸カルシウム法、DEAE-DEXTRAN法、リポフェクチン法、エレクトロポレーション法等により行なうことができる。この際に、形質転換体の選択を容易にするために、発現ベクター上のマーカー遺伝子の欠損した動物細胞を用いる方法が一般に用いられる。

【0022】(6) 形質転換細胞の培養:形質転換動物細胞を、常法に従って、適当な生育条件下で培養させ、適当な培養時間経過後、目的の蛋白質を形質転換体の細胞質あるいは培養上清中に発現させ、産生された目的の発現蛋白質を適当な方法で回収する。適当な培養条件は予備実験により容易に決定され得る。

【0023】(7) 発現産物の抽出と精製の工程:この工程では、従来技術を組み合わせる利用できる。例えば、濾過、塩析、遠心分離、カラムクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより目的の蛋白質を抽出精製することができる。培養上清からの発現蛋白質の回収は常法の生化学的な精製方法であれば、特に限定されないが、例えば日本脳炎ウイルスに対する抗体を使ったアフィニティークロマトグラフィー等は好ましい態様である。

【0024】(8) 発現産物の抗原性と免疫原性を検定する工程:この工程では、従来技術を組み合わせる利用できる。例えば免疫学的測定方法に基づく酵素結合抗体免疫アッセイ(ELISA)等および中和試験(50%プラーク減少法)等を組み合わせる検定することができる。

【0025】以上、本発明について概説したが、本発明の一実施態様の概略を図示すると図6に示すとおりである。

【0026】かくして、本発明によれば、好適なベクターに日本脳炎ウイルス由来のE蛋白質をコードするcDNAがプロモーターの制御下に組み込まれた組換えプラスミドが得られ、この組換えプラスミドを哺乳動物細胞に作用させて形質転換させ、該形質転換動物細胞を培養することにより、日本脳炎ウイルスのE蛋白質を得ることができる。

【0027】本発明によって得られるE蛋白質はワクチンや診断試薬として極めて有用である。ワクチンの調製は、本発明の抗原を、滅菌済みの生理食塩水、リン酸緩衝液等の等張液に添加して行なう。この場合、ペプトン、アミノ酸、糖類等を安定化剤として使用することができる。また、液状ワクチンだけでなく、免疫原性を向上させるため、アジュバントを添加した沈降ワクチンや高度に安定化し輸送を用いるために凍結乾燥ワクチンとすることも可能である。また、分子接合法や細胞内での翻訳後の修飾法を用いて、本発明の蛋白質抗原に糖類を導入し、免疫原性を高めることも可能である。

【0028】また、本発明のE蛋白質は、日本脳炎ウイルスのみならず抗原性が近縁ないし類似しているフラビウイルス属の感染の免疫学的診断薬として有用である。例えば、ELISA、赤血球凝集試験、赤血球凝集阻止試験、受身凝集試験、補体結合試験、更に蛍光色素、酵素および放射性同位元素等で標識された抗原または抗体を用いるその他の種々の試験において有用である。

【0029】日本脳炎ウイルス抗体の検出および同定用

の抗原として用いる場合には、上記の各種試験法の公知の術式により調製かつ使用する。本発明の抗原を用いて抗体を作製する場合には、本発明の抗原を実験用動物に接種し、抗体を産生させた後、被接種動物の血液または体液を採取するかまたは公知の細胞融合技術を用いる。これにより容易に作製されるポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体は日本脳炎ウイルス抗原の検出および同定用の抗体として上記の各種試験法の公知の術式に従って調製かつ使用できる。

10 【0030】以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本発明は何等これらに限定されるものではない。

【0031】

【実施例】

実施例1

日本脳炎ウイルスE蛋白質をコードするcDNAの作製

(1) 日本脳炎ウイルスからのRNAゲノムの抽出

蚊由来の株化細胞C6/36(J. Gen. Virol.

40, 531-544(1978))に日本脳炎ウイルスS

20 agayama株を感染させ、ウイルスを増殖させた後に、培養上清とポリエチレングリコールとを混合し、遠心分離により日本脳炎ウイルスを精製した。ウイルスゲノムRNA(約11kbp)は精製ウイルスからフェノール抽出後、エタノールを加えて沈澱させ分離した。

【0032】(2) 日本脳炎ウイルスのcDNAのクローニング

(1)で調製したウイルスゲノムRNAにポリ(A)ポリメラーゼ(宝酒造)を使って、ポリ(A)を付加し、それを鋳型とし、オリゴd(T)をプライマーに用いて、4種(A・G・C・T)のデオキシリボヌクレオチド三リン酸と、逆転写酵素を働かせて、ファーストストランドcDNAを合成した。次に大腸菌RNaseHと、4種(A・G・C・T)のデオキシリボヌクレオチド三リン酸と大腸菌DNAポリメラーゼを使って二本鎖cDNAを作製し(Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Lab.) p. 211-246(1982))、ターミナルトランスフェラーゼでdC鎖を付加した。一方、プラスミドpUC9(ファルマシア社製)を制限酵素PstIで消化後、ターミナルトランスフェラーゼでdG鎖を付加し、これと、前記cDNAを混合し、ライゲーション反応を行ない環状化した。この組換えプラスミドを大腸菌HB101コンピテントセルに導入し、形質転換菌を得た。形質転換菌からプラスミドを取り出し、インサートされたcDNAの長さをアガロースゲルで比較し、最も長いインサートcDNAについて5'側の配列分析(Gene 19, p. 269(1982))を行なった。その配列分析の結果より、20-merの合成オリゴヌクレオチド(5'-dATTCGGTACCATG CAGTCCA-3')をプライマーとし、ウイルスゲノムRNAを鋳型にして、再度上記の方法でcDNAを作製し、

30 プラスミドpUC9にライゲーションし、多数の形質転

換菌を得た。得られた形質転換菌の中から目的の表面抗原蛋白質をコードするcDNAを含む組換えプラスミドを含む形質転換菌を以下に述べる方法で選択した。なお、日本脳炎ウイルスのcDNAクローンの作製方法については、日本脳炎ウイルス Ja0Ars 982株を使い、同様な方法で作製した例がGene 48, p. 195-201(1986)に記載されている。

【0033】(3) 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質をコードするcDNA(4118)を含む組換えプラスミドpJE4118のスクリーニング

(2)で得られた形質転換菌を寒天プレートで生育させ、ニトロセルロースフィルターにレプリカする。レプリカしたフィルターを0.2%NP-40(界面活性剤、半井化学)で緩やかに洗浄した後、抗JE血清でイムノスクリーニングしたところ、ポジティブに反応する形質転換菌を1株得て、その株が保有するプラスミドをpJE4118とした。次いで、プラスミドpJE4118を常法(Molecular Cloning p. 75~95、前記)に従い調製し、制限酵素Pst IでpUC9に挿入されたcDNAを切り出し、これをDNAプローブとして、(2)で得られた各種形質転換菌をコロニーハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning p. 382~387、前記)によってスクリーニングし、pJE4118のインサートcDNA(4118)と重なり合うcDNAを有するプラスミドを選択した。こうして選出されたcDNA(2-20)をプラスミドより回収し、制限酵素でその位置関係を決定したところ(図7~8参照)、cDNA(2-20)はcDNA(4118)のN末端と部分的に重なり合っていることが判明した。

【0034】(4) 表面抗原蛋白質をコードするcDNAの塩基配列の解明(図1~5参照)

組換えプラスミドpJE4118とpJE2-20を制限酵素Pst Iで切断し、それぞれ約2.5kbp、約1.0kbpのDNA断片を得た。これらの断片について、M13ファージを用いるメッシングらの方法(ジーン(Gene)19, p. 269(1982))、サイエンス(Science)241, p. 1205(1981)により、cDNA(4118)の場合は5'側から、cDNA(2-20)の場合は3'側から配列分析を行なった。

【0035】その結果、両者が重なり合う部分のcDNA配列は図1~5中の第5番アミノ酸の第3コドンから第116番アミノ酸までの334塩基であることが判明した。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列と、既に公知(サイエンス(Science)229, p. 726-733(1985))である黄熱病ウイルス(日本脳炎ウイルスと同属近縁)のE蛋白質のアミノ酸配列の比較から、日本脳炎ウイルスのE蛋白質は図1~5に示す+1番目から第500番目のアミノ酸までであると判断された。

【0036】同様に、日本脳炎ウイルスのM蛋白質は図

1~5に示す第75番目から第1番目のアミノ酸まで、またPreM蛋白質は第167番目から第76番目までと判断された。さらに、PreM蛋白質の5'側は日本脳炎ウイルスのC蛋白質の一部をコードしていると判断された。

【0037】(5) 日本脳炎ウイルス表面抗原蛋白質をコードするcDNAの作製(図1~5および図7~8参照)

cDNA(4118)がコードするアミノ酸はE蛋白質のN末端の5アミノ酸が欠けている。そこでcDNA(2-20)を用いて、Aat IIサイトの位置でつなぎ合わせて、E蛋白質を完全にカバーするcDNA(203)を得た。次いで、cDNA(203)をHind IIIとEcoRVで処理し、約2.7kbpのcDNA断片(J3)を回収した。この断片はE蛋白質をコードする領域に加えてM蛋白質およびPreM蛋白質をコードする領域を含んでいる。

【0038】実施例2

日本脳炎ウイルスE蛋白質をコードするcDNAを挿入した組換えベクターの作製

実施例1の(5)で得たcDNA(J3)をE. Coli DNAポリメラーゼ(Klenow断片)で末端を修復し、制限酵素Sma Iで切断したpACYMS1とT4 DNAリガーゼを使って接続後、JM109を形質転換した。数個の形質転換株より、プラスミドを精製し、pACYMS1のSma I部位に、前記cDNA(J3)が正方向に挿入されているプラスミドを適当な制限酵素を用いた切断パターンの結果より選択する。こうして得た組換えベクターをpACYMS-J3と命名した。

【0039】C蛋白質のアンカー領域(105番目のアルギニンから127番目のアラニン)、Pre-M、M蛋白質およびE蛋白質をコードするcDNAをpcDL-SRα296ベクターのPst I-EcoRIサイトに挿入した(pcDL-SRα-J12)。この組換え体は大腸菌DH1株に導入し形質転換してクローニングを行なった。

【0040】同様に、C蛋白質の全部、Pre-M、M蛋白質およびE蛋白質をコードするcDNAをpcDL-SRα296ベクターのPst I-EcoRIサイトに挿入し、この組換え体は大腸菌DH1株に導入し形質転換してクローニングを行なった(pcDL-SRα-J18)。

【0041】対照用に、日本脳炎ウイルス非構造領域の蛋白質であるNS2BおよびNS3をコードするcDNAをpcDL-SRα296ベクターに挿入し、pcDL-SRα-JNS2B3とした。

【0042】実施例3

哺乳動物細胞を宿主とする日本脳炎ウイルスE蛋白質の発現

(1) 動物細胞の形質転換法

実施例2で得られた各種の組換えベクターをリポフェクション法でCOS7細胞(アフリカミドリザル腎由来SV40形質転換細胞)に移入した。100ng/6cmプレートのDNA量を用いた。Vero細胞では5μg/プレートを用いたところreplicationによるコピー数の増加はないにもかかわらずCOS細胞に近い発現レベルを得ることができた。その他の細胞としてヒト、サル等の細胞は全て使用できるものと考えられる。他に使用可能なベクターとしてはpMAM-neoベクター(CHO細胞を使用)が検討され得る。

【0043】(2) 評価系について

イムノプレシペーション:トランスフェクション2日後に³⁵S-メチオニン、³⁵S-システイン(0.4mCi/6cm)で16時間細胞をラベルした。上清を回収し、細胞は洗浄後RIPA溶液に溶解させ、それぞれ抗JEV抗体とプロテインA-Sepharoseを用いて免疫沈降し、16%SDS-PAGEにてウイルス蛋白質の解析を行なった。また、細胞上清を回収し、ウェスタン-ブロット法でもウイルス蛋白質を解析した。結果を図9に示す。E蛋白質をコードする領域を挿入した各発現ベクターを用いた場合、細胞質内では所望のE蛋白質の発現が確認されたが、E蛋白質をコードする領域が存在しないベクター(pCDL-SRα-JNS2B3)においては予想どおりE蛋白質の発現は認められない。また、C蛋白質のアンカー領域(105番目のアルギニンから127番目のアラニン)、Pre-M、M蛋白質およびE蛋白質をコードするcDNAが挿入されたベクター、pCDL-SRα-J12の場合は細胞質のみならず、培養細胞上清中にもE蛋白質が産生されることは特筆すべき事項である。

【0044】蛍光抗体を用いた解析:チャンバースライ *

配列

```

ATCACGTTCT TCAAGTTTAC AGCATTAGCC CCGACCAAGG CGCTTTTAGG CCGATGGAAA 60
GCAGTGGAAG AGAGTGTGGC AATGAAACAT CTTACTAGTT TCAAACGAGA ACTTGGAACA 120
CTCATTGACG CCGTGAACAA GCGGGGAGAG AAACAAAACA AAAGAGGAGG AAATGAAGGC 180
TCAATCATGT GGCTCGCAAG CTGGCAGTT GTCATAGCTT ACGCAGGAGC AATGAAGTTG 240
TOGAATTTCC AGGGGAAGCT TTTGATGACC ATCAACAACA CGGACATTGC AGACGTTATC 300
CTGATTCCCA CCTCAAAAGG AGCGAACATA TGCTGGGTCC GGGCAATAGA CGTCGGCTAC 360
ATGTGTGAGG AACTATCAC GTACGAATGT CCTAAGTTCA CCATGGGCAA TGATCCAGAG 420
GATGTGGATT GTCGGTGTGA CAACCAAGAA GTCTACGTCA AATATGGACG GTGCACGCGG 480
ACCAGGCATT CCAAGCGAAG CAGGAGATCC GTGTCGGTCC AAACACATGG GGAGAGTTCA 540
CTAGTGAATA AAAAAGAGGC TTGGCTGGAT TCAACGAAAG CCACACGGTA TCTCATGAAA 600
ACTGAGAAGT GGATCATAAG GAATCCTGGC TATGCTTCTC TGGCGGCGGT ACTTGGCTGG 660
ATGCTTGGCA GTAACAACGG TCAACGCGTG GTATTACCA TCCTCCTGCT GTTGGTCGCT 720
CCGGCTTACA GTTTTAATTG TCTGGGAATG GGCAATCGTG ACTTCATAGA AGGAGCCAGT 780
GGAGCCACTT GGGTGGACTT GGTGCTAGAA GGAGATAGCT GCTTGACAAAT CATGGCAAAC 840
GACAAACCAA CATTGGACGT CCGCATGATT AACATCGAAG CTAGCCAACT TGCTGAGGTC 900
AGAAGTTACT GCTATCATGC TTCAGTCACT GACATCAAGA CGGTGGCTCG GAGCCCCACG 960
ACTGGAGAAG CCCACAACGA GAAGCGAGCT GATAGTAGCT ATGTGTGCAA ACAAGGCTTC 1020
ACTGATCGTG GGTGGGGCAA CGGATGTGGA CTGTCGGGA AGGGAAGCAT TGACACATGT 1080

```

* ドにCOS細胞を増殖させ、同様にpCDL-SRα-J12をトランスフェクションした。2日後に細胞をアセトンで固定し、抗JEV抗体および2次抗体として抗マウスIgG-FITCで免疫染色した。図10中、白色で示される部分が発現物質と抗体とが反応している箇所を示す。pCDL-SRα-J12の場合はE蛋白質の効率的な発現が観察される(図10参照)。

【0045】ELISA: pCDL-SRα-J12をトランスフェクションしたCOS7細胞の培養上清を回収し、10%PEG、1MNaClで、E蛋白質およびPre-M蛋白質を沈澱させ、沈さを10~40%のsucrose gradientで分画し、得られたE蛋白質を抗E蛋白質モノクローナル抗体(201)を用いELISA法で検出した。ピーク分画を集め、抗JEV抗体あるいは各種の抗E蛋白質モノクローナル抗体でエピトープの検出を行なった。ELISA法は2次抗体として抗マウスIgG-Peroxidaseを使用し、OPD、H₂O₂の発色系で発色させOD₄₉₂で吸光度の測定を行なった。使用した抗体についてはジャーナル オブ ヴィロロジー(J. of Virology), 45, p. 124~132(1983)に詳細が記されている。

【0046】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2910

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

30 起源 生物名: ウイルス

13

14

GCAAAATTCT CCTGCACCAG CAAAGCGATT GGAAGAACAA TCCAGCCAGA AAACATCAAA 1140
 TACGAAGTTG GCATTTTGT GCATGGAACC ACCACTTCGG AAAACCATGG GAATTATTCA 1200
 GCGCAAGTTG GGGCGTCCCA GGGCGCAAAG TTCACAGTAA CACCCAATGC TCCTTCGATA 1260
 ACCCTCAAAC TTGGTGACTA CGGAGAAGTC ACGCTGGACT GTGAGCCAAG GAGTGGACTG 1320
 AACACTGAAG CGTTTACGT CATGACCGTG GGGTCAAAGT CATTCTGGT CCATAGGGAA 1380
 TGGTTTCATG ACCTCGCTCT CCGCTGGACG TCCCCTTCGA GCACAGCGTG GAGAAACAGA 1440
 GAACTCCTCA TGGAAATTGA AGAGGCGCAC GCCACAAAAC AGTCCGCTGT TGCTCTTGGG 1500
 TCACAGGAAG GAGGCTCCA TCAGGCGTTG GCAGGAGCCA TCGTGGTGA GACTCAAGC 1560
 TCAGTGAAGT TAACATCAGG CCACCTGAAA TGTAGGCTGA AAATGGACCC CCTGAAGTTG 1620
 AAAGGCACTA CGTACGGCAT GTGTACAGAA AAATTCTCGT TCGCGAAAAA TTCGGCAGAC 1680
 ACTGGCCACG GAACAGTCGT CATTGAACTA TCCTACTCTG GGAGTGATGG CCCCTGCAAA 1740
 ATTCCAATTG TCTCCGTTGC GAGCTCAAT GACATGACCC TGGTTGGCCG GCTGGTGACA 1800
 GTGAACCCCTT TCTGCGGAC TTCCAGTGCC AACTCAAAGG TGCTGGTCGA GATGGAACCC 1860
 CCCTTCGGAG ACTCCTACAT CGTGGTTGGA TGGGAGACA AGCAGATCAA CCACCATTTG 1920
 CACAAAGCTG GAAGCAGCGC TAGCAAGGCC TTTTCAACAA CTTTGAAGGG AGCTCAAAGA 1980
 CTGGCAGCGT TGGGCGACAC AGCCTGGGAC TTTGGCTCCA TTGGAGGGGT CTTCAACTCC 2040
 ATAGGAAAAG CCGTTCACCA AGTGTTCGT GGTGCCTTCA GAACACTCTT TGGGGGAATG 2100
 TCTTGATCA CACAAGGCT AATGGGTGCC TACTACTCT GGATGGCGT CAACGCACGA 2160
 GACCGATCAA TTGCTTTGGC CTTCTTAGCC ACAGGAGGTG TGCTCGTGT CTTAGCGACC 2220
 AATGTGCATG CTGACACTGG ATGTGCCTTT GACATCACA GAAAAGAGAT GAGATGTGGA 2280
 AGTGGCATCT TTGTGCACA CGACGTGGA GCCTGGGTGG ACAGGTATAA ATACTTGCCA 2340
 GAAACGCCCA GATCCCTAGC GAAGATCGTC CACAAAGCGC ACAAGGAAGG CGTGTGCGGA 2400
 GTCAGATCTG TCACTAGATT GGAGCACCAA ATGTGGGAAG CCGTACGGGA CGAATTGAAC 2460
 GTCCTGCTCA AAGAGAATGC AGTGGACCTC AGTGTGGTTG TGAACAAGCC CGTGGGAAGA 2520
 TATCGCTCAG CCCCTAAACG CCTATCCATG ACGCAAGAGA AGTTTGAAAT GGGCTGGAAA 2580
 GCATGGGGGA AAAGCATTCT CTTTGCCCCG GAATTGGCTA ACTCCACATT TGTCGTAGAT 2640
 GGACCTGAGA CAAAGGAATG CCCTGATGAG AATAGAGCTT GGAACAGCAT GCAAATCGAA 2700
 GACTTCGGCT TTGGCATCAC ATCAACCCGT GTGTGGCTGA AAATTAGAGA GGAGAGCACT 2760
 GACGAGTGTG ATGGAGCGAT CATAGGCACG GCTGTCAAAG GACATGTGGC AGTCCATAGT 2820
 GACTTGTCTG ACTGGATTGA GAGTCGTAC AACGACACAT GGAAACTTGA GAGGCGAGTC 2880
 TTTGAGAGG TCAAATCTTG CACTTGCCCA 2910

【図面の簡単な説明】

【図 1】 日本脳炎ウイルス E 蛋白質をコードする領域を含む cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

【図 2】 日本脳炎ウイルス E 蛋白質をコードする領域を含む cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。(図 1 の続き)

【図 3】 日本脳炎ウイルス E 蛋白質をコードする領域を含む cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。(図 2 の続き)

【図 4】 日本脳炎ウイルス E 蛋白質をコードする領域を含む cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。(図 3 の続き)

【図 5】 日本脳炎ウイルス E 蛋白質をコードする領域 *

* を含む cDNA の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。(図 4 の続き)

【図 6】 本願発明の操作手順の概略を示す図である。

【図 7】 本願発明に係る cDNA の制限酵素サイトの位置関係および遺伝子断片の位置を示す図である。

【図 8】 本願発明に係る cDNA の制限酵素サイトの位置関係および遺伝子断片の位置を示す図である。(図 7 の続き)

40 【図 9】 本願発明によって発現された蛋白質のイムノプレシピテーションの結果を示す電気泳動図(図面代用写真)である。

【図 10】 本願発明によって発現された蛋白質の蛍光抗体を用いた解析結果を示す生物(細胞)の形態図(図面代用写真)である。

【図1】

2-20
 -248
 ATC ACG TTC TTC AAG TTT ACA GCA TTA GCC CCG ACC AAG GCG CTT TTA GGC CGA
 Ile Thr Phe Phe Lys Phe Thr Ala Leu Ala Pro Thr Lys Ala Leu Leu Gly Arg
 -227
 TGG AAA GCA GTG GAA AAG AGT GTG GCA ATG AAA CAT CTT ACT AGT TTC AAA CGA
 Trp Lys Ala Val Glu Lys Ser Val Ala MET Lys His Leu Thr Ser Phe Lys Arg
 -209
 GAA CTT GGA ACA CTC ATT GAC GCC GTG AAC AAG CCG GGC AGA AAA CAA AAC AAA
 Glu Leu Gly Thr Leu Ile Asp Ala Val Asn Lys Arg Gly Arg Lys Gln Asn Lys
 -191
 AGA GGA GGA AAT GAA GGC TCA ATC ATG TGG CTC GCA AGC TTG GCA GTT GTC ATA
 Arg Gly Gly Asn Glu Gly Ser Ile MET Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile
 -173
 GCT TAC GCA GGA GCA ATG AAG TTG TCG AAT TTC CAG GGG AAG CTT TTG ATG ACC
 Ala Tyr Ala Gly Ala MET Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu MET Thr
 -155
 ATC AAC AAC ACC GAC ATT GCA GAC GTT ATC CTG ATT CCC ACC TCA AAA GGA GCG
 Ile Asn Asn Thr Asp Ile Ala Asp Val Ile Leu Ile Pro Thr Ser Lys Gly Ala
 -137
 AAC ATA TGC TGG GTC CCG GCA ATA GAC GTC GGC TAC ATG TGT GAG GAC ACT ATC
 Asn Ile Cys Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr MET Cys Glu Asp Thr Ile
 -119
 ACG TAC GAA TGT CCT AAG TTC ACC ATG GGC AAT GAT CCA GAG GAT GTG GAT TGT
 Thr Tyr Glu Cys Pro Lys Phe Thr MET Gly Asn Asp Pro Glu Asp Val Asp Cys
 -101
 CCG TGT GAC AAC CAA GAA GTC TAC GTC AAA TAT GGA CCG TGC ACG CCG ACC AGG
 Arg Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Lys Tyr Gly Arg Cys Thr Arg Thr Arg
 -83
 CAT TCC AAG CGA AGC AGG AGA TCC GTG TCG GTC CAA ACA CAT GGG GAG AGT TCA
 His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val Ser Val Gln Thr His Gly Glu Ser Ser
 -65

【図2】

-47
 CTA GTG AAT AAA AAA GAG GCT TGG CTG GAT TCA ACG AAA GCC ACA CCG TAT CTC
 Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala Trp Leu Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu
 -29
 ATG AAA ACT GAG AAC TGG ATC ATA AGG AAT CCT GGC TAT GCT TCT CTG GCG GCG
 MET Lys Thr Glu Asn Trp Ile Ile Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Ser Leu Ala Ala
 -11
 GTA CTT GGC TGG ATG CTT GGC AGT AAC AAC GGT CAA CCG GTG GTA TTT ACC ATC
 Val Leu Gly Trp MET Leu Gly Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile
 -118
 CTC CTG CTG TTG GTC GCT CCG GAT TAC AGT TTT AAT TGT CTG GGA ATG GGC AAT
 Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly MET Gly Asn
 +8
 CGT GAC TTC ATA GAA GGA GCC AGT GGA GCC ACT TGG GTG GAC TTG GTG CTA GAA
 Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Gln
 +28
 GGA GAT AGC TGC TTG ACA ATC ATG GCA AAC GAC AAA CCA ACA TTG GAC GTC CGC
 Gly Asp Ser Cys Leu Thr Ile MET Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val Arg
 +44
 ATG ATT AAC ATC GAA GCT AGC CAA CTT GCT GAG GTC AGA AGT TAC TGC TAT CAT
 MET Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His
 +62
 GCT TCA GTC ACT GAC ATC ACG ACG GTG GCT CCG AGC CCC ACG ACT GGA GAA GCC
 Ala Ser Val Thr Asp Ile Thr Thr Val Ala Arg Ser Pro Thr Thr Gly Glu Ala
 +80
 CAC AAC GAG AAG CGA GCT GAT AGT AGC TAT GTG TGC AAA CAA GGC TTC ACT GAT
 His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp
 +98
 CGT GGG TGG GGC AAC GGA TGT GGA CTT TTC GGG AAG GGA AGC ATT GAC ACA TGT
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys
 +118

図1の続き

【図3】

+134
 GCA AAA TTC TCG TGC ACC AGC AAA GCG ATT GGA AGA ACA ATC CAG CCA GAA AAC
 Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn
 +152
 ATC AAA TAC GAA GTT GGC ATT TTT GTG CAT GGA ACC ACC ACT TCG GAA AAC CAT
 Ile Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His
 +170
 GGG AAT TAT TCA GCG CAA GTT GGG GCG TCC CAG GCG GCA AAG TTC ACA GTA ACA
 Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr
 +188
 CCC AAT GCT CCT TCG ATA ACC CTC AAA CTT GGT GAC TAC GGA GAA GTC ACG CTG
 Pro Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr Leu
 +206
 GAC TGT GAG CCA AGG AGT GGA CTG AAC ACT GAA GCG TTT TAC GTC ATG ACC GTG
 Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val MET Thr Val
 +224
 GGG TCA AAG TCA TTT CTG GTC CAT AGG GAA TGG TTT CAT GAC CTC GCT CTC CCC
 Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro
 +242
 TGG ACG TCC CCT TCG AGC ACA GCG TGG AGA AAC AGA GAA CTC CTC ATG GAA TTT
 Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu MET Glu Phe
 +260
 GAA GAG GCG CAC GCC ACA AAA CAG TCC GCT GTT OCT CTT GGG TCA CAG GAA GCA
 Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Ala Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 +278
 GGC CTC CAT CAG GCG TTG GCA GGA GCC ATC GTG GTG GAG TAC TCA AOC TCA GTG
 Gly Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val
 HpaI
 +296
 AAG TTA ACA TCA GGC CAC CTG AAA TGT AGG CTG AAA ATG GAC CCC CTG AAG TTG
 Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys MET Asp Pro Leu Lys Leu

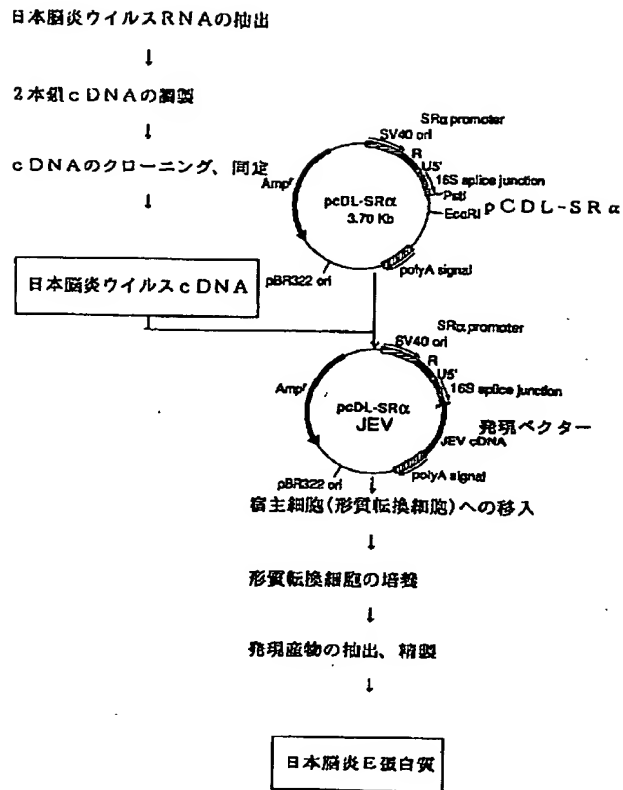
図3の続き

【図4】

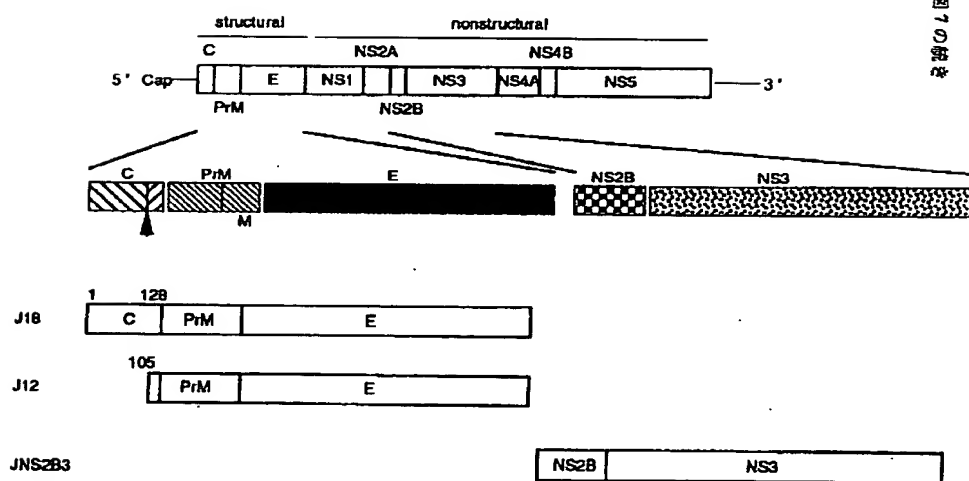
+314
 AAA GGC ACT ACG TAC GGC ATG TGT ACA GAA AAA TTC TCG TTC GCG AAA AAT TCG
 Lys Gly Thr Thr Tyr Gly MET Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Ser
 +332
 GCA GAC ACT GGC CAC GGA ACA GTC GTC ATT GAA CTA TCC TAC TCT GGG AGT GAT
 Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser Asp
 +350
 GGC CCC TGC AAA ATT CCA ATT GTC TCC GTT GCG AGC CTC AAT GAC ATG ACC CTG
 Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp MET Thr Leu
 +368
 GTT GGC CGG CTG GTG ACA GTG AAC CCT TTC TGC GCG ACT TCC AGT GCC AAC TCA
 Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Cys Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser
 +386
 AAG GTG CTG GTC GAG ATG GAA CCC CCC TTC GGA GAC TCC TAC ATC GTG GTT GGA
 Lys Val Leu Val Glu MET Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly
 +404
 TGG GGA GAC AAG CAG ATC AAC CAC CAT TGG CAC AAA GCT GGA AGC AGC GCT AGC
 Trp Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Ser Ser Ala Ser
 +422
 AAG GCC TTT TCA ACA ACT TTG AAG GGA GCT CAA AOA CTG GCA GCG TTG GGC GAC
 Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp
 +440
 ACA GCC TGG GAC TTT GGC TCC ATT GGA GGG GTC TTC AAC TCC ATA GGA AAA GCC
 Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala
 +458
 GTT CAC CAA GTG TTT GGT GGT GCC TTC AGA ACA CTC TTT GGG GGA ATG TCT TCG
 Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly MET Ser Trp
 +476
 ATC ACA CAA GGG CTA ATG GGT GCC CTA CTA CTC TGG ATG GGC GTC AAC GCA CGA
 Ile Thr Gln Gly Leu MET Gly Ala Leu Leu Leu Trp MET Gly Val Asn Ala Arg

図3の続き

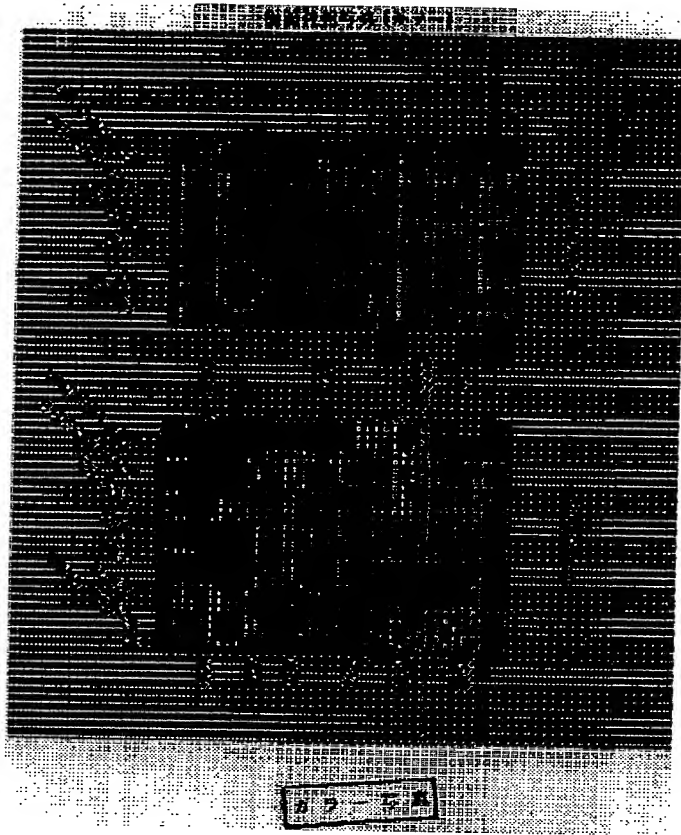
【図6】



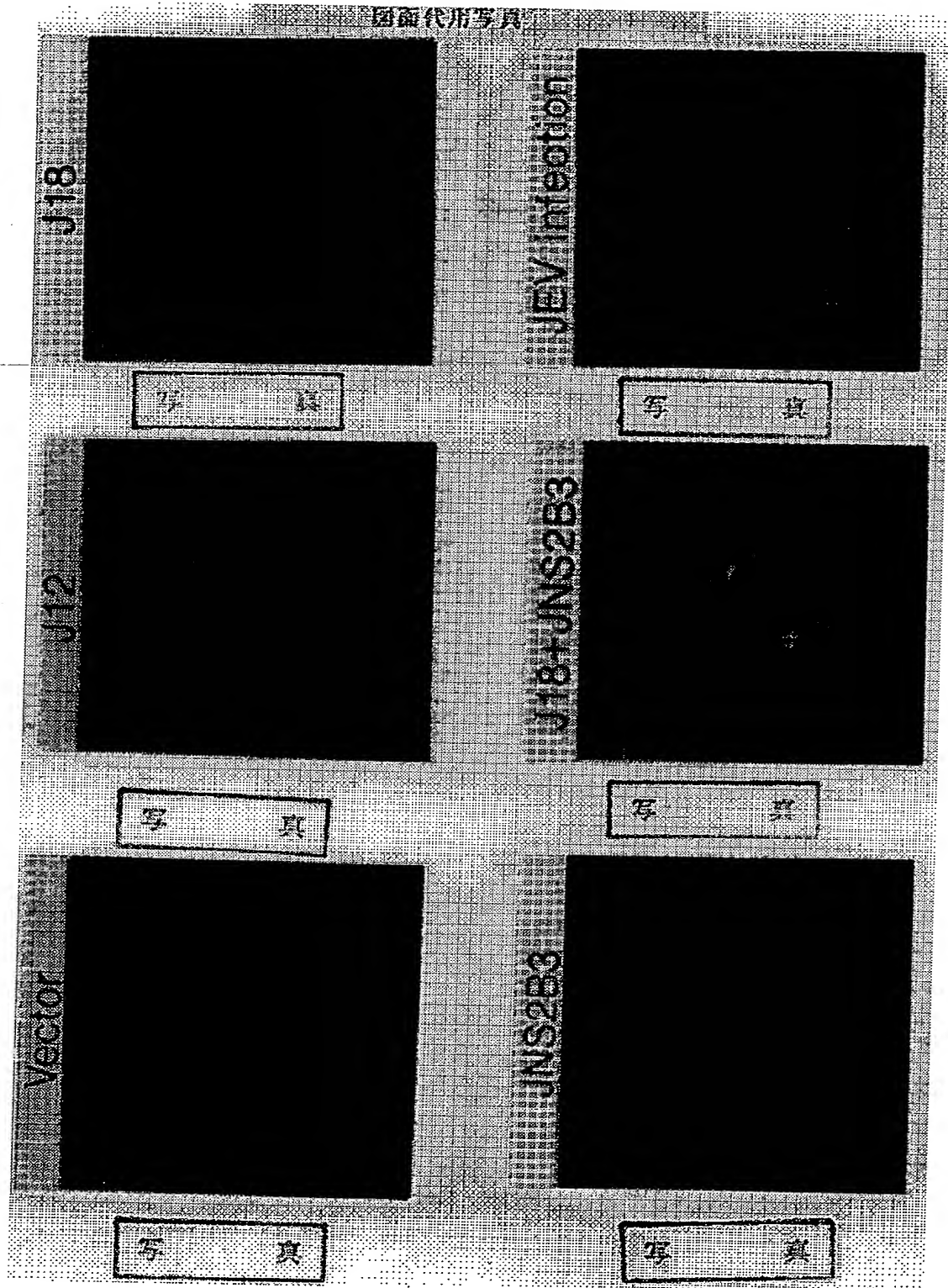
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-------|--------|---------------|--------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| // A 6 1 K 39/12 | A D Y | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |
| (C 1 2 N 5/10 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |
| | | | (C 1 2 N 5/00 | B |
| | | | C 1 2 R 1:91) | |